

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

#4

In re Patent Application of

GUTIERREZ-ARMENTA

Serial No. 10/025,676

Filed: December 26, 2001

For: PLANT RETINOBLASTOMA-ASSOCIATED PROTEINS



Atty. Ref.: 4148-6

Group: 1638

Examiner: Mehta, A.

March 18, 2002

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Sir:

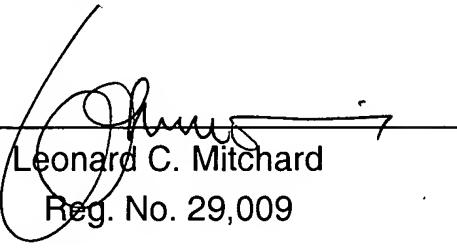
It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
PCT/ES96/00130	WO	June 13, 1996

Respectfully submitted,

NIXON & VANDERHYE P.C.

By: _____


Leonard C. Mitchard

Reg. No. 29,009

LCM:iks

1100 North Glebe Road, 8th Floor

Arlington, VA 22201-4714

Telephone: (703) 816-4000

Facsimile: (703) 816-4100



101625,676

#4

AT 1638
presta

OFICINA ESPAÑOLA

de

PATENTES y MARCAS

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número PCT/ES96/00130, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 13 de Junio de 1996.

Madrid, 17 de enero de 2002



El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M MADRUGA

COPIA PARA LA OFICINA RECEPTORA

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada de conformidad con el Tratado de Cooperación en materia de Patentes.



Para uso de la Oficina receptora únicamente

S E S 9 6 / 0 0 1 3 0	
Solicitud internacional N°	
13 JUN 1996	13.06.96
Fecha de presentación internacional	
DEMANDE INTERNATIONALE PCT SOLICITUDE INTERNACIONAL PCT	
Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud internacional PCT"	
Referencia al expediente del solicitante o del mandatario (si se desea) (como máximo, 12 caracteres)	

RO

Recuadro N° I TITULO DE LA INVENTION

PROTEINAS VEGETALES

Recuadro N° II SOLICITANTE

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Serrano, 117
28006 MADRID
ESPAÑA

Esta persona es también un inventor.

Nº de teléfono

Nº de fax

Nº de teleimpresora

Estado de nacionalidad:

ESPAÑA

Estado de domicilio:

ESPAÑA

Esta persona es solicitante para: todos los Estados designados todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América los Estados Unidos de América únicamente los Estados indicados en el recuadro suplementario

Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

GUTIERREZ-ARMENTA, Crisanto
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Universidad Autónoma
28049 CANTOBLANCO (Madrid)
ESPAÑA

Esta persona es:

solicitante únicamente

solicitante e inventor

inventor únicamente
(Si se marca esta casilla, no se debe llenar lo que sigue.)

Estado de nacionalidad:

ESPAÑA

Estado de domicilio:

ESPAÑA

Esta persona es solicitante para: todos los Estados designados todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América los Estados Unidos de América únicamente los Estados indicados en el recuadro suplementario

Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.

Recuadro N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMUN: O DIRECCION PARA LA CORRESPONDENCIA

La persona abajo identificada se designa/ha sido designada para actuar en nombre del/ mandatario representante común de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

POLO FLORES, Carlos

Nº de teléfono

344.13.75

Nº de fax

344.13.97

Nº de teleimpresora

Marquese esta casilla cuando no se designe/se haya designado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utilice en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.

Continuación del recuadro N° III OTROS SOLICITANTES Y/O (OTROS) INVENTORES

Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

XIE, Qi
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Universidad Autónoma
28049 CANTOBLANCO (Madrid)
España

Esta persona es:

solicitante únicamente
 solicitante e inventor
 inventor únicamente
(Si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

Estado de nacionalidad:

CHINA

Estado de domicilio:

ESPAÑA

Esta persona es solicitante para: todos los Estados designados todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América los Estados Unidos de América únicamente los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

PELAYO SANZ-BURGOS, Andrés
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Universidad Autónoma
28049 CANTOBLANCO (Madrid)
España

Esta persona es:

solicitante únicamente
 solicitante e inventor
 inventor únicamente
(Si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

Estado de nacionalidad:

ESPAÑA

Estado de domicilio:

ESPAÑA

Esta persona es solicitante para: todos los Estados designados todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América los Estados Unidos de América únicamente los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

SUAREZ LOPEZ, Paula
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Universidad Autónoma
28049 CANTOBLANCO (Madrid)
España

Esta persona es:

solicitante únicamente
 solicitante e inventor
 inventor únicamente
(Si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

Estado de nacionalidad:

ESPAÑA

Estado de domicilio:

ESPAÑA

Esta persona es solicitante para: todos los Estados designados todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América los Estados Unidos de América únicamente los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: (Apellido seguido del nombre; en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

Esta persona es:

solicitante únicamente
 solicitante e inventor
 inventor únicamente
(Si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)

Estado de nacionalidad:

Estado de domicilio:

Esta persona es solicitante para: todos los Estados designados todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América los Estados Unidos de América únicamente los Estados indicados en el recuadro suplementario

Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.

Véanse las Notas al formulario del petitorio

Recuadro N° V DESIGNACION DE ESTADOS

A continuación se hacen las designaciones siguientes en virtud de la Regla 4.9.a) (marquense las casillas adecuadas: debe marcarse por lo menos una):

Patente regional

AP Patente ARIPO : KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudán, SZ Swazilandia, UG Uganda, y cualquier otro Estado contratante del Protocolo de Harare y del PCT

EA Patente Euroasiática: AZ Azerbaiyán, BY Belarús, KZ Kazakstán, RU Federación de Rusia, TJ Tayikistán, TM Turkmenistán, y cualquier otro Estado contratante del Convenio sobre la Patente Euroasiática y del PCT

EP Patente Europea: AT Austria, BE Bélgica, CH y LI Suiza y Liechtenstein, DE Alemania, DK Dinamarca, ES España, FR Francia, GB Reino Unido, GR Grecia, IE Irlanda, IT Italia, LU Luxemburgo, MC Mónaco, NL Países Bajos, PT Portugal, SE Suecia, y cualquier otro Estado contratante del Convenio sobre la Patente Europea y del PCT

OA Patente OAPI : BF Burkina Faso, BJ Benín, CF República Centroafricana, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Camerún, GA Gabón, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Níger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo y cualquier otro Estado que sea Estado miembro de la OAPI y que sea un Estado contratante del PCT (si se desea otra forma de protección o de tramitación, específiquese en la línea de puntos)

Patente nacional (si se desea otra forma de protección o de tramitación, específiquese en la línea de puntos):

<input type="checkbox"/> AL Albania	<input type="checkbox"/> MD República de Moldova
<input type="checkbox"/> AM Armenia	<input type="checkbox"/> MG Madagascar
<input type="checkbox"/> AT Austria	<input type="checkbox"/> MK Ex República Yugoslava de Macedonia
<input type="checkbox"/> AU Australia	<input type="checkbox"/> MN Mongolia
<input type="checkbox"/> AZ Azerbaiyán	<input type="checkbox"/> MW Malawi
<input type="checkbox"/> BB Barbados	<input type="checkbox"/> MX México
<input type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input type="checkbox"/> NO Noruega
<input type="checkbox"/> BR Brasil	<input type="checkbox"/> NZ Nueva Zelanda
<input type="checkbox"/> BY Belarús	<input type="checkbox"/> PL Polonia
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canadá	<input type="checkbox"/> PT Portugal
<input type="checkbox"/> CH y LI Suiza y Liechtenstein	<input type="checkbox"/> RO Rumania
<input type="checkbox"/> CN China	<input type="checkbox"/> RU Federación de Rusia
<input type="checkbox"/> CZ República Checa	<input type="checkbox"/> SD Sudán
<input type="checkbox"/> DE Alemania	<input type="checkbox"/> SE Suecia
<input type="checkbox"/> DK Dinamarca	<input type="checkbox"/> SG Singapur
<input type="checkbox"/> EE Estonia	<input type="checkbox"/> SI Eslovenia
<input type="checkbox"/> ES España	<input type="checkbox"/> SK Eslovaquia
<input type="checkbox"/> FI Finlandia	<input type="checkbox"/> TJ Tayikistán
<input type="checkbox"/> GB Reino Unido	<input type="checkbox"/> TM Turkmenistán
<input type="checkbox"/> GE Georgia	<input type="checkbox"/> TR Turquía
<input type="checkbox"/> HU Hungría	<input type="checkbox"/> TT Trinidad y Tabago
<input type="checkbox"/> IS Islandia	<input type="checkbox"/> UA Ucrania
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japón	<input type="checkbox"/> UG Uganda
<input type="checkbox"/> KE Kenia	<input checked="" type="checkbox"/> US Estados Unidos de América
<input type="checkbox"/> KG Kirguistán	<input type="checkbox"/> UZ Uzbekistán
<input type="checkbox"/> KP República Popular Democrática de Corea	<input type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input type="checkbox"/> KR República de Corea	
<input type="checkbox"/> KZ Kazakstán	
<input type="checkbox"/> LK Sri Lanka	
<input type="checkbox"/> LR Liberia	
<input type="checkbox"/> LS Lesotho	
<input type="checkbox"/> LT Lituania	
<input type="checkbox"/> LU Luxemburgo	
<input type="checkbox"/> LV Letonia	

Casillas reservadas para designar Estados (a los fines de una patente nacional) que han pasado a formar parte del PCT después de la publicación de la presente hoja:

<input type="checkbox"/>

Además de las designaciones arriba efectuadas, el solicitante efectuará también, en virtud de la Regla 4.9.b), todas las designaciones que estén permitidas con arreglo al PCT, salvo la designación o designaciones de

El solicitante declara que esas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación que no se confirme antes de que expiren los 15 meses a partir de la fecha prioritaria se considerará retirada por el solicitante al expirar dicho plazo. (La confirmación de una designación consiste en la presentación de un aviso en el que se especifique dicha designación, así como el pago de las tasas de designación y confirmación. La confirmación deberá llegar a la Oficina receptora dentro de ese plazo de 15 meses.)

Recuadro N° VI REIVINDICACION DE PRIORIDAD

Se indican otras reivindicaciones de prioridad en el Recuadro suplementario

Se reivindica la prioridad de la/solicitud(es) anterior(es) siguiente(s):

País (en el que ha sido o para el que ha sido presentada la solicitud)	Fecha de presentación (día/mes/año)	Solicitud N°	Oficina de presentación (sólo para una solicitud regional o internacional)
Punto (1)			
Punto (2)			
Punto (3)			

Márquese la siguiente casilla si la copia certificada de la solicitud anterior ha de ser emitida por la Oficina que, a los efectos de la presente solicitud internacional, es la Oficina receptora (se podrá exigir el pago de una tasa):

Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmítala a la Oficina Internacional una copia certificada de la solicitud anterior/de las solicitudes anteriores identificada(s) supra como punto o puntos: _____

Recuadro N° VII ADMINISTRACION ENCARGADA DE LA BUSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Administración encargada de la búsqueda internacional (Si dos o más Administraciones encargadas de la búsqueda internacional son competentes para efectuar el examen preliminar internacional, indíquese el nombre de la Administración elegida; se puede utilizar el código de dos letras):

ISA / ES

Búsqueda anterior: Relléñese si ya se ha efectuado o solicitado una búsqueda (internacional, de tipo internacional u otra) a la Administración encargada de la búsqueda internacional y si se pide ahora a dicha Administración que base la búsqueda internacional, en la medida de lo posible, en los resultados de dicha búsqueda anterior. Se ruega identificarla refiriéndose a la solicitud pertinente (o a su traducción) o a la solicitud de búsqueda.

País (u Oficina regional): Fecha (día/mes/año): Número:

Recuadro N° VIII LISTA DE VERIFICACION

La presente solicitud internacional contiene el siguiente número de hojas:

1. petitorio : 4 hojas
2. descripción : 27 hojas
3. reivindicaciones : 4 hojas
4. resumen : 1 hojas
5. dibujos : 2 hojas
Total : 38 hojas

La presente solicitud internacional está acompañada de los documentos que se identifican a continuación:

1. <input checked="" type="checkbox"/> poder separado firmado	5. <input checked="" type="checkbox"/> hoja de cálculo de tasas
2. <input type="checkbox"/> copia del poder general	6. <input checked="" type="checkbox"/> indicación separada relativa a los microorganismos depositados
3. <input type="checkbox"/> declaración que explica la ausencia de una firma	7. <input checked="" type="checkbox"/> relación de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos (disquete)
4. <input type="checkbox"/> documento(s) de prioridad identificado(s) en el Recuadro N° VI como punto o puntos:	8. <input checked="" type="checkbox"/> otros (especifíquese): <u>diskettes</u>

Se sugiere la figura N° 2 de los dibujos (en su caso) para acompañar el resumen en el momento de su publicación.

Recuadro N° IX FIRMA DEL SOLICITANTE O DEL MANDATARIO

Junto a cada una de las firmas, indíquese el nombre de la persona que firma, así como su calidad (si dicha calidad no es evidente por lectura del petitorio).



Carlos Polo Flores

Para la Oficina receptora únicamente

1. Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional:

13 JUN 1996

13.06.96

2. Dibujos:

 recibidos:

3. Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completen la pretendida solicitud internacional:

 no recibidos:

4. Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones solicitadas según el Artículo 11.2) del PCT:

5. Administración de búsqueda internacional especificada por el solicitante: ISA / ES

6. Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda.

Para uso de la Oficina Internacional únicamente

Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional:

Véanse las Notas al formulario del petitorio

PROTEÍNAS VEGETALESDESCRIPCION

La presente invención se refiere a proteínas que tienen actividad biológica en sistemas vegetales y animales, a polinucleótidos que codifican para la expresión de dichas proteínas, a oligonucleótidos para usarse en la identificación y síntesis de estas proteínas y polinucleótidos, a vectores y células que contienen los polinucleótidos en forma recombinante y a plantas y animales que comprenden estos elementos, y al uso de las proteínas, polinucleótidos y fragmentos de los mismos en el control del crecimiento de las plantas y de la vulnerabilidad de las plantas a virus.

La progresión del ciclo celular se regula mediante efectores positivos y negativos. Entre los últimos, el producto del gen de susceptibilidad a retinoblastoma (Rb) controla el paso de células de mamíferos a través de la fase G1. En las células de mamíferos, Rb regula el tránsito G1/S mediante la inhibición de la función de la familia de factores de transcripción E2F, de la que se sabe que interacciona con secuencias de la región promotora de genes necesarios para la replicación del ADN de la célula (véase, por ejemplo, Weinberg, R.A. Cell 81, 323 (1995); Nevins, J.R. Science 258, 424 (1992)). Los virus tumorales de ADN que infectan células animales expresan oncoproteínas que interaccionan con la proteína Rb mediante un motivo LXCXE, rompiendo complejos Rb-E2F y promoviendo que las células entren en fase S (Weinberg ibid; Ludlow, J.W. FASEB J. 7, 866 (1993); Moran, E. FASEB J. 7, 880 (1993); Vousden, K. FASEB J. 7, 872 (1993)).

Los presentes inventores han demostrado que la replicación eficaz de un geminivirus vegetal requiere la integridad de un motivo de aminoácidos LXCXE en la proteína viral RepA y que RepA puede interaccionar con

miembros de la familia Rb humana en levaduras (Xie, Q. Suárez-López, P. y Gutiérrez, C. EMBO J. 14, 4073 (1995)). También se ha publicado la presencia del motivo LXCXE en ciclinas vegetales de tipo D (Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H. y Murray, J. A. H. Plant Cell 7, 85-103 (1995)).

Actualmente, los presentes inventores han identificado por primera vez secuencias características de proteínas Rb vegetales y los correspondientes 10 polinucleótidos codificantes, han aislado dichas proteínas y polinucleótidos y, en particular, han identificado secuencias que los distinguen de secuencias proteicas Rb animales conocidas. Los inventores han determinado que una secuencia de DNA conocida procedente 15 de maíz que codifica una proteína Rb vegetal y se denomina en lo sucesivo ZmRb1. Los inventores han demostrado que ZmRb1 interacciona en levaduras con RepA, una proteína vegetal de geminivirus que contiene un motivo LXCXE esencial para su función. Los inventores han 20 determinado adicionalmente que se reduce la replicación de ADN de geminivirus en células vegetales transfectadas con plásmidos que codifican ZmRb1 o p130 humano, un miembro de la familia Rb humana.

Significativamente, el trabajo de los inventores 25 sugiere que las células animales y vegetales pueden compartir estrategias fundamentalmente similares para el control del crecimiento y, por lo tanto, es de esperar que proteínas Rb tanto de humanos como de plantas, tales como ZmRb1, tengan utilidad, entre otros, en fines 30 terapéuticos para vegetales, diagnosis, control del crecimiento o investigaciones y muchas de dichas proteínas vegetales tendrán una utilidad similar en los animales.

En un primer aspecto de la presente invención, se 35 proporciona el uso de la proteína de retinoblastoma en el

- 3 -

control del crecimiento de células vegetales y/o virus vegetales. Particularmente, la presente invención proporciona el control de la infección viral y/o el crecimiento de células vegetales, donde el virus requiere la integridad de un motivo de aminoácidos LXCXE en una de sus proteínas, particularmente, por ejemplo, en la proteína viral RepA, para la reproducción normal. Los virus vegetales particulares así controlados son Geminivirus.

Un procedimiento preferido de control que usa dichas proteínas incluye la aplicación de éstas a la célula vegetal, bien directamente o mediante introducción de ADN o ARN que codifica para su expresión en la célula vegetal que se desea tratar. Mediante la sobre-expresión de la proteína de retinoblastoma o la expresión de una proteína Rb o un fragmento peptídico de la misma que interacciona con el motivo LXCXE del virus, pero que no afecta al funcionamiento normal de la célula, es posible inhibir el crecimiento viral normal y, por lo tanto, también reducir la propagación de la infección de esta célula a sus vecinas.

Alternativamente, por introducción de ADN o ARN antisentido en células de platas en forma de vectores que contengan los promotores necesarios para la transcripción del ADN o ARN, será posible explotar el bien conocido mecanismo de antisentido para inhibir la expresión de la proteína Rb, y por ello de la fase S. Tales plantas serían de utilidad, entre otros aspectos, para replicar ADN y ARN hasta elevados niveles, por ejemplo en levaduras. Los métodos para introducir ADN antisentido en células son bien conocidos para los expertos en el tema: véase por ejemplo "Principles of gene manipulation - An introduction to Genetic Engineering (1994) R.W. Old & S.B. Primrose; Oxford-Blackwell Scientific Publications Fifth Edition p398.

- 4 -

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico recombinante, particularmente en forma de ADN o ARNc (ARNm), que codifica para la expresión de la proteína Rb que es 5 característica de plantas. Este ácido nucleico se caracteriza por una o varias regiones características que difieren del ácido nucleico de la proteína Rb animal conocida y se ejemplifica aquí por la SEC ID No 1, bases 31-2079.

10 El ADN o ARN puede tener una secuencia que contenga sustituciones degeneradas en los nucleótidos de los codones en SEQ ID No. 1, y donde el ARN la T es U. Los ADN o ARN más preferidos son capaces de hibridar con el polinucleótido de la SEQ ID No. 1 en condiciones de baja 15 estringencia, preferiblemente siendo capaz de esa hibridación en condiciones de alta estringencia.

Las expresiones "condiciones de baja estringencia" y "condiciones de alta estringencia" son entendidas por los expertos, pero se simplifican convenientemente en US 20 5202257, Col-9-Col 10. Si se hicieran modificaciones que donduzcan a la expresión de una proteína con diferentes aminoácidos, preferiblemente de la misma clase a los aminoácidos correspondientes a la SEQ ID No. 1; es decir 25 son sustituciones conservativas. Tales sustituciones son conocidas por los expertos, por ejemplo, ver US 5380712, y se contempla solo cuando la proteína tenga actividad con proteína retinoblastoma.

El ADN o ARNc preferido codifica para una proteína Rb vegetal que tiene subdominios de bolsillo A y B que 30 tienen entre un 30% y un 75% de homología con la proteína Rb humana, particularmente en comparación con p130, más preferiblemente entre un 50% y un 64% de homología. Particularmente, la proteína Rb vegetal así codificada ha conservado el aminoácido C706 de la Rb humana. 35 Preferiblemente, la secuencia espaciadora entre los

bolsillos A y B no se conserva con respecto a las proteínas Rb animales, preferiblemente, teniendo una homología inferior al 50% con la misma región que se encuentra en dichas proteínas animales. Más 5 preferiblemente, la proteína así codificada tiene una homología del 80% o mayor con la de la SEC ID No 2 de la lista de secuencias adjunta, aún más preferiblemente de un 90% o mayor y más preferiblemente de un 95% o mayor. Particularmente, se proporciona un ADN recombinante de 10 SEC ID No 1, bases 31 a 2079, o la SEC ID No 1 entera, o los correspondientes ARN que codifican para el clon de ADNc de maíz que codifica ZmRb1 de la SEC ID No. 2.

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona la proteína expresada por el ADN o ARN 15 recombinante del segundo aspecto, nuevas proteínas derivadas de dicho ADN o ARN y una proteína derivada del ADN o ARN que se produce de forma natural, mediante medios mutagénicos tales como el uso de cebadores de PCR mutagénicos.

20 En un cuarto aspecto, se proporcionan vectores, células, vegetales y animales que comprenden el ADN o ARN recombinante de sentido correcto o antisentido, de la invención.

En un uso particularmente preferido del primer 25 aspecto, se proporciona un procedimiento para controlar el crecimiento celular o viral que comprende la administración de ADN, ARN o proteínas del segundo o tercer aspecto, a la célula. Dicha administración puede ser directa en el caso de proteínas o puede incluir medios indirectos, tales como electroporación o células de semillas vegetales con ADN o por transformación de células con vectores de expresión capaces de expresar o sobre-expresar las proteínas de la invención o fragmentos 30 de las mismas que son capaces de inhibir el crecimiento de las mismas que son capaces de inhibir el crecimiento 35 celular o viral.

- 6 -

Alternativamente, el método utiliza un vector de expresión capaz de producir ARN antisentido del cDNA de la invención.

Otra de las características particulares de la 5 proteína de las plantas y de los ácidos nucleicos incluye un dominio N-terminal correspondiente en secuencia a los aminoácidos 1 a 90 de la SEQ ID No. 2 y una secuencia de nucleótidos correspondiente a las bases 10 31 a 300 de la SEQ ID No. 1. Estas secuencias se caracterizan por poseer menos de 150 y menos de 450 unidades que las secuencias animales que poseen más de 300 aminoácidos y 900 pares de bases más.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante referencia a los siguientes Ejemplos no 15 limitantes. A los especialistas se les ocurrirán otras realizaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a la luz de éstos.

Figuras.

Fig.1 La sub-figura A muestra las longitudes relativas de 20 la presente proteína ZmRb1 y las proteínas de retinoblastoma humanas. La sub-figura B muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los Pocket A y Pocket B de la ZmRb1 con las de Xenopus, pollo, ratón y tres proteínas humanas (Rb, p107 y p130). 25

Fig.2 Esta figura es una mapa de las principales características del virus WDV y el vector pWori derivado de WDV y las posiciones de las delecciones y mutaciones utilizadas para establecer que el motivo LXCXE se 30 requiere para su replicación en células de plantas.

EJEMPLO 1

Aislamiento de ADN y clones de expresión de proteínas

Se aisló ARN total a partir de raíz de maíz y de hojas maduras triturando el material previamente 35 congelado en nitrógeno líquido esencialmente como se

- 7 -

describe en Soni et al (1995). Se identificaron los ARNm de p75ZmRb1 mayoritarios y minoritarios mediante hibridación a un fragmento interno PstI marcado con ^{32}P cebado aleatoriamente (1,4 kb).

5 Se seleccionó una parte de la biblioteca de ADNc de maíz (106 pfu) en IZAPII (Stratagene) mediante la hibridación posterior con oligonucleótidos marcados en el extremo 5' diseñados para ser complementarios a una secuencia EST conocida de maíz homóloga de p130. Estos 10 oligonucleótidos fueron 5'-AATAGACACATCGATCAA/G (M. 5m, posiciones de nucleótidos 1411-1438) y 5'-GTAATGATAACCAACATGG (M. 3c, posiciones de nucleótidos 1606-1590) (Isogen Biosciences).

15 Después del segundo ciclo de selección, se aislaron fagémidos pBluescript SK- (pBS) procedentes de los clones positivos por escisión in vivo con el fago auxiliar ExAssist (Stratagene) de acuerdo con protocolos recomendados por el fabricante. Se llevó a cabo la secuenciación de ADN usando un equipo Sequenase TM (USB).

20 Se determinó el extremo 5' de los ARNm que codificaban p75ZmRb1 por RACE-PCR. Se purificó Poli-A + ARNm por cromatografía sobre oligo-dT-celulosa (Amersham). La primera cadena se sintetizó usando el oligonucleótido DraI35 (5'-GATTAAAATCAAGCTCC, posiciones 25 de nucleótidos 113-96). Después de la desnaturación a 90°C durante 3 minutos, se eliminó el ARN por tratamiento con RNasa, se recuperó el ADNc y se creó una cola en la posición 5' con transferasa terminal y dATP. Después, se amplificó un fragmento de PCR usando el cebador DraI35 y el engarce-cebador (50 pb) del equipo de 30 síntesis de ADNc de Stratagene.

35 Uno de los clones positivos (pBS.Rb1) así producidos contenía un inserto de ~ 4 kb que, según el análisis de restricción, se prolongaba a los extremos 5' y 3' de la región contenida en la Secuencia Tag Expresada usada. La

secuencia de nucleótidos correspondiente al inserto de ADNc más largo (3747 pb) se muestra en la SEC ID No 1. Este ADNc de ZmRb1 contiene una sola fase de lectura abierta capaz de codificar una proteína de 683 aminoácidos (predeterminada Mr 75247, p75ZmRb1) seguida por una región 3' no traducida de 1646 pb. También se han encontrado regiones no traducidas de longitud similar en ADNc de Rb de mamíferos (Lec, W. L, et al., Science 235, 1394 (1987); Bernards, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6474 (1989)). El análisis de Northern indica que las células de maíz derivadas tanto de meristemos de raíz como de hojas maduras contiene un mensajero principal de $-2,7 \pm 0,2$ kb de longitud. Además, también aparece un mensajero minoritario de $\sim 3,7 \pm 0,2$ kb. Se han detectado transcritos heterogéneos en otras especies (Destréé, O. H. J. et al., Dev. Biol. 153, 141 (1992)).

Se construyó el plásmido pWoriΔΔ mediante la delección en pWori de la mayoría de las secuencias que codifican proteínas de WDV (Sanz y Gutiérrez, no publicado). El plásmido p35S.Rb1 se construyó mediante la inserción del promotor CaMV 35S (obtenido a partir de pWDV3:35SGUS) cadena arriba del ADNc de ZmRb1 en el vector pBS. El plásmido p35S.130 se construyó introduciendo la secuencia codificante completa de p130 humano en lugar de secuencias ZmRb1 en el interior de p35S.Rb1. El plásmido p35.A+B se construyó mediante la sustitución de secuencias que codifican los ORF de Rep A y Rep B de WDV en lugar de ZmRb1 en el plásmido p35S.Rb1 (Sec Soni, R. y Murray, J.A. H. Anal. Biochem, 218, 474-476 (1994)).

La secuencia alrededor del codón de metionina en la posición de nucleótido 31 contiene un comienzo de la traducción consenso (Kozak, M. J. Mol. Biol. 196, 947 (1987)). Para determinar si el ADNc contenía la región codificante de ZmRb1 completa, el extremo 5' del ARNm se

amplificó por RACE-PCR usando un oligonucleótido derivado de una región cercana al supuesto iniciador AUG, que produce un fragmento de ~150 pb. Los resultados son consistentes con el clon de ADNC de ZmRb1 que contiene la 5 región codificante completa.

La proteína ZmRb1 contiene segmentos homólogos a los subdominios A y B del "bolsillo" que está presente en todos los miembros de la familia Rb. Estos subdominios están separados por un espaciador no conservado. El ZmRb1 10 también contiene dominios N-terminales y C-terminales no conservados. En general, el ZmRb1 comparte una identidad de aminoácidos del ~28-30% (similaridad del ~50%) con los miembros de la familia Rb (Hannon, G. J., Demetrick, D. & Beach, D. Genes Dev. 7, 2378 (1993); Cobrinik, D., 15 Whyte, P., Peepoer, D.S., Jacks, T. & Weinberg, R.A. ibid., p. 2392 (1993). Ewen, M.E., Xing, Y., Lawrence, J.B. y Livingston, D. M. Cell 66, 1155 (1991)) (Lee W. L. et al, Science 235, 1394 (1987); Bernards et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6974 (1989)), presentando los 20 subdominios A y B la mayor homología (~50-64%). Sorprendentemente, el aminoácido C706 de la Rb humana, crítico para su función (Kaye, F.J., Kratzke, R.A., Gerster, J.L. y Horowitz, J. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6922 (1990)), también se conserva en p75ZmRb1 de 25 maíz.

Nota: Los aminoácidos 561-577 abarcan un dominio rico en prolina.

ZmRb1 contiene 16 sitios consenso, SP o TP, para fosforilación por kinasas dependientes de ciclina (CDKs) 30 con uno en el extremo 5' del subdominio A y varios en la zona C-terminal que son sitios potenciales de fosforilación. Un grupo preferido de ácidos nucleicos que codifican proteínas en las que uno o más de estos sitios están alterados o delecionados, convirtiendo a la 35 proteína más resistente a la fosforilación y así, a su

- 10 -

funcionalidad, por ejemplo, unión a E2F o similares. Esto se puede realizar fácilmente mediante mutagénesis dirigida mediante PCR.

5 EJEMPLO 2

Actividad in vivo

La replicación de geminivirus de trigo enano (WDV) es dependiente de un motivo LXCXE intacto de la proteína RepA viral. Este motivo puede mediar la interacción con 10 un miembro de la familia Rb humana, p130, en levaduras. Por lo tanto, los inventores investigaron si p75ZmRb1 podría complejarse con RepA de WDV usando el sistema de dos híbridos de levadura (Fields, S. y Song, O. Nature 340, 245-264 (1989)). Se cotransformaron células de 15 levadura con un plásmido que codificaba la proteína de fusión GAL4BD-RepA y con plásmidos que codificaban diferentes proteínas de fusión GAL4AD. La fusión GAL4AD-p75ZmRb1 también podía complejarse con GAL4BD-RepA para permitir el crecimiento de las células de levadura 20 receptoras en ausencia de histidina. Esta interacción fue ligeramente más fuerte que la observada con la proteína humana p130. La RepA también pudo unirse en alguna medida a la forma truncada en el N-terminal de p75ZmRb1. El papel del motivo LXCXE en la interacción RepA-p75ZmRb1 se 25 determinó usando una mutación puntual en RepA de WDV (E198K), de la que se ha demostrado anteriormente que destruye la interacción con p130 humana. La cotransformación de ZmRb1 con un plásmido que codificaba la fusión GAL4BD-RepA (E198K) indicó que la interacción 30 entre RepA y p75ZmRb1 se producía a través del motivo LXCXE.

A este respecto, el mutante E198K de RepA de WDV se comporta de forma similar a mutaciones puntuales análogas de oncoproteínas de virus animales (Moran, E., Zerler, 35 B., Harrison, T.M. y Mathews, M. B. Mol. Cell Biol. 6,

- 11 -

3470 (1986); Cherington, V. et al., *ibid*, p. 1380 (1988); Lillic, J. W., Lowenstein, P. M., Green, M. R. y Green, M. *Cell* 50, 1091 (1987); DeCaprio, J. A. et al., *ibid.*, p.275 (1988)).

5 La interacción específica entre p75ZmRb1 de maíz y RepA de WDV en el sistema de dos híbridos de levadura (Fields et al) se basaba en la capacidad de reconstituir una actividad GAL4 funcional a partir de dos proteínas de fusión GAL4 separadas que contienen el dominio de unión de ADN (GAL4BD) y el dominio de activación (GAL4AD). Se cotransformaron células HF7c de levadura con un plásmido que expresaba las fusiones GAL4BD-RepA o GAL4BD-RepA(E198K) y los plásmidos que expresaban GAL4AD solo (Vec) o unido a p130 humano, p75(p75ZmRb1) de maíz o una 10 delección N-terminal de 69 aminoácidos de p75(p75ZmRb1-DN). Las células se alinearon en placas con o sin histidina de acuerdo con la distribución mostrada en la 15 esquina izquierda superior. La capacidad de crecer en ausencia de histidina depende de la reconstitución funcional de una actividad GAL4 tras la interacción de las proteínas de fusión, ya que esto activa la expresión del gen HIS3, que está bajo el control del elemento de respuesta GAL4. Las características del crecimiento de estos cotransformantes de levadura están relacionadas con 20 los niveles de la actividad b-galactosidasa.

25

En Xie et al (1995) se describen procedimientos para el análisis de dos híbridos. Las fusiones GAL4AD-ZmRb1 se construyeron en el vector pGAD424.

30 EJEMPLO 3

Actividad in vivo

La replicación del ADN de geminivirus requiere la maquinaria celular de replicación de ADN así como otros factores específicos de la fase S (Davies, J. W. y 35 Stanley, J. *Trends Genet.* 5, 77 (1989); Lazarowitz, S.

- 12 -

Crit. Rev. Plant Sci. 11, 327 (1992)). Consistente con este requisito, la infección por geminivirus parece promover que células no proliferantes entre en la fase S, como se indica por la acumulación del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), una proteína que normalmente no está presente en los núcleos de células diferenciadas (Nagar, S., Pedersen, T. J., Carrick, K. M., Hanley-Bowdoin, L. y Robertson, D. Plant Cell 7, 705 (1995)). Los hallazgos de los inventores de que la replicación eficaz de ADN de WDV requiere un motivo LXCXE intacto en RepA junto con el descubrimiento de un homólogo vegetal de Rb, apoya al modelo de que, como en células animales, la formación de complejos de Rb vegetal con proteínas RepA virales, promueve la entrada inapropiada de células infectadas en la fase S. Por lo tanto, una forma de investigar la función de p75ZmRb1 fue medir la replicación del ADN de geminivirus en células transfectadas con un plásmido que llevaba las secuencias ZmRb1 bajo un promotor funcional en células vegetales, un método análogo al usado previamente en células humanas (Uzvolgi, E. et al., Cell Growth Diff. 2, 297 (1991)). La acumulación de ADN plasmídico viral nuevamente replicado se vio perjudicada en células de trigo transfectadas con plásmidos que expresaban p75ZmRb1 o p130 humano, cuando la expresión de la(s) proteína(s) de replicación de WDV está dirigida por el promotor de WDV o por el promotor CaMV 35S.

Como la replicación de ADN de WDV requiere un medio celular en fase S, la interferencia con la replicación de ADN viral por p75ZmRb1 y p130 humano demuestra fuertemente un papel para la proteína de retinoblastoma en el control de la transición G1/S en las plantas. La existencia de un homólogo de Rb vegetal implica que, a pesar de su antigua divergencia, las células vegetales y animales usan, al menos en parte, proteínas reguladoras

y rutas similares para el control del ciclo celular.

Dos líneas de evidencia refuerzan este modelo. En primer lugar, en células de alfalfa se ha identificado un gen que codifica una proteína que complementa específicamente a la transición a G1/S pero no a la transición G2/M del mutante cdc28 de levadura en fase de germinación (Hirt, H., Páy, A., Bögre, L., Meskiene, I. y Heberle-Bors, E. *Plant J.* 4, 61 (1993)). En segundo lugar, se han aislado homólogos vegetales de ciclinas de tipo D a partir de *Arabidopsis* y éstos, como sus parientes procedentes de mamíferos, contienen motivos LXCXE. En relación con las versiones vegetales de CDK4 y CDK6, las ciclinas vegetales de tipo D pueden regular el paso a través de la fase G1 mediante el control del estado de fosforilación de proteínas semejantes a Rb.

En células animales, la familia Rb se ha implicado en la supresión de tumores y en el control de la diferenciación y el desarrollo. Así pues, p75ZmRb1 también podría jugar papeles reguladores clave a otros niveles durante la vida de la célula vegetal. Una cuestión clave que surge por la existencia de homólogos de Rb en células vegetales, es si, como en animales, la interrupción de la ruta de Rb conduce a un trastorno de tendencia a tumores. A este respecto, los inventores han observado que la proteína VirB4 codificada por los plásmidos Ti tanto de *Agrobacterium tumefaciens* como de *A. rhizogenes*, contiene un motivo LXCXE. Aunque la proteína VirB4 es necesaria para la inducción tumoral (Hooykas, P. J.J. y Beijersbergen, A. G. M. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 57 (1994), queda por examinar la función de su motivo LXCXE en este contexto. La infección por geminivirus no está acompañada por el desarrollo de tumores en la planta infectada pero, en algunos casos, se ha observado un crecimiento anormal de ejemplares enanos (G. Dafalla y B. Gronenborn, comunicación personal).

Se llevó a cabo la inhibición de la replicación de ADN de geminivirus de trigo enano (WDV) por ZmRb1 o p130 humano en células de trigo cultivadas, como se indica a continuación. A. Se transfecaron células de trigo, como se ha indicado, con pWori (Xie et al. 1995) solo (0,5 g), un plásmido de replicación basado en WDV que codifica las proteínas de WDV necesarias para la replicación del ADN viral y con el plásmido de control pBS (10 g) o p35S.Rb1 (10 g), que codifica secuencias ZmRb1 bajo el control del promotor CaMV 35S. Se purificó el ADN total uno y dos días después de la transfección, se fraccionó en cantidades iguales en geles de agarosa y marcaje con bromuro de etidio) y se identificó el ADN viral de pWori por hibridación de Southern. El ADN plasmídico representa exclusivamente el ADN del plásmido nuevamente replicado, ya que es totalmente resistente a la digestión con DpnI y sensible a MboI. Debe indicarse que las muestras digeridas con MboI se representan por aproximadamente la mitad de la longitud que las muestras no digeridas. B. Para ensayar el efecto de p130 humano sobre la replicación de ADN de WDV, se cotransfecaron células de trigo con pWori (0,5 g) y plásmidos pBS (control), p35S.Rb1 o p35S.130 (10 g en cada caso). La replicación del plásmido de ensayo (p Wori) se analizó dos días después de la transfección y se detectó como se describe en la parte A usando marcaje con bromuro de etidio; y hibridación de Southern C. Para ensayar el efecto de ZmRb1 o p130 humano sobre la replicación de ADN de WDV cuando la expresión de proteínas virales estaba dirigida por el promotor CaMV 35S, se usó el plásmido de ensayo pWoriDD (que no codifica proteínas de replicación de WDV funcionales pero se replica cuando éstas se proporcionan por un plásmido diferente, es decir, pWori). Se cotransfecaron células de trigo, como se ha indicado, con pWori^Δ (0,25 g), pWori (0,25 g) p35S.A B (6 g),

- 15 -

p35S.Rb1 (10 g) y/o p35S.130 (10 g). La replicación del plásmido de ensayo (pWoriDD) se analizó 36 horas después de la transfección y se detectó como se describe en la parte A usando marcaje con bromuro de etidio, hibridación de Southern. Se usaron plásmidos pWori (M1) y pWori^Δ (M2, Sanz y Gutiérrez, no publicado), 100 pg en cada caso, como marcadores. Se llevaron a cabo cultivos en suspensión de células de trigo, transfección por bombardeo de partículas y análisis de la replicación de ADN viral como se describe en (Xie et al 1995), con la excepción de que la extracción de ADN se modificó como en (Soni y Murray. Arnal. Biochem. 218, 474-476 (1995)).

- 16 -

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: CRISANTO GUTIÉRREZ ARMENTA
(A) NOMBRE: QI XIE
(A) NOMBRE: ANDRES PELAYO SANZ-BURGOS
(A) NOMBRE: PAULA SUAREZ-LOPEZ
(B) CALLE: CSIC-UAM, UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA, CANTOBLANCO
(C) CIUDAD: MADRID
(E) PAÍS: ESPAÑA
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 28049

5 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PROTEÍNAS VEGETALES
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

10 (iv) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Licencia de Patente N°
1,0, Versión N° 1,30 (EPO)

15

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3747 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

25

(C) CADENA: doble
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
(iii) HIPOTÉTICA: NO

30 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Zea mays

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 31..2079

35

PCT / E S 96 / 00130

- 17 -

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

GAATTGGCA CGAGCAAAGG TCTGATTGAT ATG GAA TGT TTC CAG TCA AAT TTG 54
Met Glu Cys Phe Gln Ser Asn Leu
1 5

GAA AAA ATG GAG AAA CTA TGT AAT TCT AAT AGC TGT AAA GGG GAG CTT 102
Glu Lys Met Glu Lys Leu Cys Asn Ser Asn Ser Cys Lys Gly Glu Leu
10 15 20

GAT TTT AAA TCA ATT TTG ATC AAT AAT GAT TAT ATT CCC TAT GAT GAG 150
Asp Phe Lys Ser Ile Leu Ile Asn Asn Asp Tyr Ile Pro Tyr Asp Glu
25 30 35 40

AAC TCG ACG GGG GAT TCC ACC AAT TTA GGA CAT TCA AAG TGT GCC TTT 198
Asn Ser Thr Gly Asp Ser Thr Asn Leu Gly His Ser Lys Cys Ala Phe
45 50 55

GAA ACA TTG GCA TCT CCC ACA AAG ACA ATA AAG AAC ATG CTG ACT GTT 246
Glu Thr Leu Ala Ser Pro Thr Lys Thr Ile Lys Asn Met Leu Thr Val
60 65 70

CCT AGT TCT CCT TTG TCA CCA GCC ACC GGT GGT TCA GTC AAG ATT GTG 294
Pro Ser Ser Pro Leu Ser Pro Ala Thr Gly Gly Ser Val Lys Ile Val
75 80 85

CAA ATG ACA CCA GTA ACT TCT GCC ATG ACG ACA GCT AAG TGG CTT CGT 342
Gln Met Thr Pro Val Thr Ser Ala Met Thr Thr Ala Lys Trp Leu Arg
90 95 100

GAG GTG ATA TCT TCA TTG CCA GAT AAG CCT TCA TCT AAG CTT CAG CAG 390
Glu Val Ile Ser Ser Leu Pro Asp Lys Pro Ser Ser Lys Leu Gln Gln
105 110 115 120

TTT CTG TCA TCA TGC GAT AGG GAT TTG ACA AAT GCT GTC ACA GAA AGG 438
Phe Leu Ser Ser Cys Asp Arg Asp Leu Thr Asn Ala Val Thr Glu Arg
125 130 135

GTC AGC ATA GTT TTG GAA GCA ATT TTT CCA ACC AAA TCT TCT GCC AAT 486
 Val Ser Ile Val Leu Glu Ala Ile Phe Pro Thr Lys Ser Ser Ala Asn
 140 145 150

CGG GGT GTA TCG TTA GGT CTC AAT TGT GCA AAT GCC TTT GAC ATT CCG 534
 Arg Gly Val Ser Leu Gly Leu Asn Cys Ala Asn Ala Phe Asp Ile Pro
 155 160 165

TGG GCA GAA GCC AGA AAA GTG GAG GCT TCC AAG TTG TAC TAT AGG GTA 582
 Trp Ala Glu Ala Arg Lys Val Glu Ala Ser Lys Leu Tyr Tyr Arg Val
 170 175 180

TTA GAG GCA ATC TGC AGA GCG GAG TTA CAA AAC AGC AAT GTC AAT AAT 630
 Leu Glu Ala Ile Cys Arg Ala Glu Leu Gln Asn Ser Asn Val Asn Asn
 185 190 195 200

CTA ACT CCA TTG CTG TCA AAT GAG CGT TTC CAC CGA TGT TTG ATT GCA 678
 Leu Thr Pro Leu Leu Ser Asn Glu Arg Phe His Arg Cys Leu Ile Ala
 205 210 215

TGT TCA GCG GAC TTA GTA TTG GCG ACA CAT AAG ACA GTC ATC ATG ATG 726
 Cys Ser Ala Asp Leu Val Leu Ala Thr His Lys Thr Val Ile Met Met
 220 225 230

TTT CCT GCT GTT CTT GAG AGT ACC GGT CTA ACT GCA TTT GAT TTG AGC 774
 Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Thr Gly Leu Thr Ala Phe Asp Leu Ser
 235 240 245

AAA ATA ATT GAG AAC TTT GTG AGA CAT GAA GAG ACC CTC CCA AGA GAA 822
 Lys Ile Ile Glu Asn Phe Val Arg His Glu Glu Thr Leu Pro Arg Glu
 250 255 260

TTG AAA AGG CAC CTA AAT TCC TTA GAA GAG CAG CTT TTG GAA AGC ATG 870
 Leu Lys Arg His Leu Asn Ser Leu Glu Glu Gln Leu Leu Glu Ser Met
 265 270 275 280

- 19 -

GCA TGG GAG AAA GGT TCA TCA TTG TAT AAC TCA CTG ATT GTT GCC AGG 918
 Ala Trp Glu Lys Gly Ser Ser Leu Tyr Asn Ser Leu Ile Val Ala Arg
 285 290 295

CCA TCT GTT GCT TCA GAA ATA AAC CGC CTT GGT CTT TTG GCT GAA CCA 966
 Pro Ser Val Ala Ser Glu Ile Asn Arg Leu Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 300 305 310

ATG CCA TCT CTT GAT GAC TTA GTG TCA AGG CAG AAT GTT CGT ATC GAG 1014
 Met Pro Ser Leu Asp Asp Leu Val Ser Arg Gln Asn Val Arg Ile Glu
 315 320 325

GGC TTG CCT GCT ACA CCA TCT AAA AAA CGT GCT GCT GGT CCA GAT GAC 1062
 Gly Leu Pro Ala Thr Pro Ser Lys Lys Arg Ala Ala Gly Pro Asp Asp
 330 335 340

AAC GCT GAT CCT CGA TCA CCA AAG AGA TCG TGC AAT GAA TCT AGG AAC 1110
 Asn Ala Asp Pro Arg Ser Pro Lys Arg Ser Cys Asn Glu Ser Arg Asn
 345 350 355 360

ACA GTA GTA GAG CGC AAT TTG CAG ACA CCT CCA CCC AAG CAA AGC CAC 1158
 Thr Val Val Glu Arg Asn Leu Gln Thr Pro Pro Pro Lys Gln Ser His
 365 370 375

ATG GTG TCA ACT AGT TTG AAA GCA AAA TGC CAT CCA CTC CAG TCC ACA 1206
 Met Val Ser Thr Ser Leu Lys Ala Lys Cys His Pro Leu Gln Ser Thr
 380 385 390

TTT GCA AGT CCA ACT GTC TGT AAT CCT GTT GGT GGG AAT GAA AAA TGT 1254
 Phe Ala Ser Pro Thr Val Cys Asn Pro Val Gly Gly Asn Glu Lys Cys
 395 400 405

GCT GAC GTG ACA ATT CAT ATA TTC TTT TCC AAG ATT CTG AAG TTG GCT 1302
 Ala Asp Val Thr Ile His Ile Phe Phe Ser Lys Ile Leu Lys Leu Ala
 410 415 420

- 20 -

GCT ATT AGA ATA AGA AAC TTG TGC GAA AGG GTT CAA TGT GTG GAA CAG 1350
 Ala Ile Arg Ile Arg Asn Leu Cys Glu Arg Val Gln Cys Val Glu Gln
 425 430 435 440

ACA GAG CGT GTG TAT AAT GTC TTC AAG CAG ATT CTT GAG CAA CAG ACA 1398
 Thr Glu Arg Val Tyr Asn Val Phe Lys Gln Ile Leu Glu Gln Gln Thr
 445 450 455

ACA TTA TTT TTT AAT AGA CAC ATC GAT CAA CTT ATC CTT TGC TGT CTT 1446
 Thr Leu Phe Phe Asn Arg His Ile Asp Gln Leu Ile Leu Cys Cys Leu
 460 465 470

TAT GGT GTT GCA AAG GTT TGT CAA TTA GAA CTC ACA TTC AGG GAG ATA 1494
 Tyr Gly Val Ala Lys Val Cys Gln Leu Glu Leu Thr Phe Arg Glu Ile
 475 480 485

CTC AAC AAT TAC AAA AGA GAA GCA CAA TGC AAG CCA GAA GTT TTT TCA 1542
 Leu Asn Asn Tyr Lys Arg Glu Ala Gln Cys Lys Pro Glu Val Phe Ser
 490 495 500

AGT ATC TAT ATT GGG AGT ACG AAC CGT AAT GGG GTA TTA GTA TCG CGC 1590
 Ser Ile Tyr Ile Gly Ser Thr Asn Arg Asn Gly Val Leu Val Ser Arg
 505 510 515 520

CAT GTT GGT ATC ATT ACT TTT TAC AAT GAG GTA TTT GTT CCA GCA GCG 1638
 His Val Gly Ile Ile Thr Phe Tyr Asn Glu Val Phe Val Pro Ala Ala
 525 530 535

AAG CCT TTC CTG GTG TCA CTA ATA TCA TCT GGT ACT CAT CCA GAA GAC 1686
 Lys Pro Phe Leu Val Ser Leu Ile Ser Ser Gly Thr His Pro Glu Asp
 540 545 550

AAG AAG AAT GCT AGT GGC CAA ATT CCT GGA TCA CCC AAG CCA TCT CCT 1734
 Lys Lys Asn Ala Ser Gly Gln Ile Pro Gly Ser Pro Lys Pro Ser Pro
 555 560 565

PCT / E S 96 / 00130

- 21 -

TTC CCA AAT TTA CCA GAT ATG TCC CCG AAG AAA GTT TCA GCA TCT CAT 1782

Phe Pro Asn Leu Pro Asp Met Ser Pro Lys Lys Val Ser Ala Ser His

570

575

580

AAT GTA TAT GTG TCT CCT TTG CCG CAA ACC AAG TTG GAT CTA CTG CTG. 1830

Asn Val Tyr Val Ser Pro Leu Arg Gin Thr Lys Leu Asp Leu Leu

585

590

595

600

TCA CCA AGT TCC AGG AGT TTT TAT GCA TGC ATT GGT GAA GGC ACC CAT 1878

Ser Pro Ser Ser Arg Ser Phe Tyr Ala Cys Ile Gly Glu Gly Thr His

605

610

615

GCT TAT CAG AGC CCA TCT AAG GAT TTG GCT GCT ATA AAT AGC CGC CTA 1926

Ala Tyr Gln Ser Pro Ser Lys Asp Leu Ala Ala Ile Asn Ser Arg Leu

620

625

630

AAT TAT AAT GGC AGG AAA GTA AAC AGT CGA TTA AAT TTC GAC ATG GTG 1974

Asn Tyr Asn Gly Arg Lys Val Asn Ser Arg Leu Asn Phe Asp Met Val

635

640

645

AGT GAC TCA GTG GTA GCC GGC AGT CTG GGC CAG ATA AAT GGT GGT TCT 2022

Ser Asp Ser Val Val Ala Gly Ser Leu Gly Gln Ile Asn Gly Gly Ser

650

655

660

ACC TCG GAT CCT GCA GCT GCA TTT AGC CCC CTT TCA AAG AAG AGA GAG 2070

Thr Ser Asp Pro Ala Ala Ala Phe Ser Pro Leu Ser Lys Lys Arg Glu

665

670

675

680

ACA GAT ACT TGATCAATTAA TAAATGGTGG CCTCTCTCGT ATATAGCTCA 2119

Thr Asp Thr

CAGATCCGTGCTCCGTAGCA GTCTATTCTTCTGAATAAGTGGATTAAC TGAGCGATTTA 2179

ACTGTACATGTATGTGTTAGTGAGAAGCAGCAGTTAGGCAGCAAACGTGTTCAAGTT 2239

AGCTTTGAGCTATCACCATTTCTCTGCTGATTGAACATA TCCGCTGTAGAGTGCTAA 2299

TGAATCTTA GTTTCATG GGCTGACATA ACAAACTTTATCCTAGTTG GCTGGTTGTT 2359

GGGAGGCATT CATCAGGGTT ATATTGGTT GTCAAAAAGT ACTGTACTTA ATTACACATCT 2419

TTCACATTCTCACTAGCAA TAGCAGCCCC AAATTGCTT CCTGACTAGGA AACATATTCT 2479

TTACAGGTATAAGCATGCCA ACTCTAAACT ATATGAATCC TTTTATATTCTCATTTTTA 2539

AGTACTTCTCTGTTCTGCTACTTTGTAC TGTATATTTC CAGCTCTCC ATCAGACTGA 2599

TGATCCCATA TTCACTGTGCTGCAAGTGATTGACCATAT GTGGCTTATC CTTCAGGTAT 2659

GTCTCATGTT GTGACTTCAT TGCTGATTGC TTTTGTAAATG GTACTGTGA GTTCATTCT 2719

GGTTACAATCAGCCTTACT GCTTATATT GTTCTACTAA TTTGGCTTG CACAGCCAGG 2779

ACGATTGGTT TTCTGCATCA ATCAATCTT TTTAGGACAA GATATTTTG TATGCTACAC 2839

TTCCCAAATTGCAATTAAATCCAGAAGTCTA CCTTGTTTA TTCTATTAGTTCTCAGCAAC 2899

AGTGAATGAA TATGAATCAGTCATGCTGATAGATGTTCATCTGGTTATTCAAACAACT 2959

GACATCGCATCTCTTGCAAGTGAGATGAAGAAAACCTGAAATGCTATCACCATTAA 3019

AACATTGGTTCTGGAAGTTCAAGTGATTAGCAGGAGACG TTCTGACATTGCCATTGACA 3079

TGTACGGTAG TGATGGCAGG AGACGTTCTT AAACAGCAGC TGCTCCTCA GCTTGTAAATG 3139

TCTGATTGTA TTGACCAAGAGCATCCACCTTGCTTATGG TACTAAGTGA ATGAGCTGGT 3199

GACGCTGACTCATCTGCATAATGGCAGATG CTTAACCATTTAGGAGCTATGTCATGA 3259

TTCCAGCTGC ACCGTGTCAA ATGTGAAGGC CCTGCAAGGC TTTCCAGGCC GCACCAATCC 3319

TGCTTGCTTC TTGAAGATACTATGGTGCC ACCTAAATAA AAGCTGTTTC TGTTATGTC 3379

TGTCCCTGACATGTCAACAG ATTAGTGTGTTGGTTGCAGTCATGTGGTGTAAAGTCTTGG 3439

AGAAGGCAGAGTCATTGCTGCCAGCATTGTGATCGTCAGGCACAGAAGTACTCAAAAG3499

TGAGAGCTAC TTGTTGCGAG CAAACGGAGG GCGATATAGG TTGATAGCCA ATTCAGTTTC3559

TCTATATACA AGCAGCGGATTITGTTAGA GTTAGCTTTGAGATGCATC ATTTCTTCA 3619

CATCTGATTCTGTGTTGTAACCGAGTCGCGTAGAAG TTAGAATGCTAACTGACCTT 3679

AATTTCAACCGAATAATTGCTAGCGTTTCAGTATGAA ATCCTTGCTTAAAAAAA 3739

AAAAAAA

3747

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 683 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

Met Glu Cys Phe Gln Ser Asn Leu Glu Lys Met Glu Lys Leu Cys Asn
1 5 10 15

Ser Asn Ser Cys Lys Gly Glu Leu Asp Phe Lys Ser Ile Leu Ile Asn
20 25 30

Asn Asp Tyr Ile Pro Tyr Asp Glu Asn Ser Thr Gly Asp Ser Thr Asn
35 40 45

Leu Gly His Ser Lys Cys Ala Phe Glu Thr Leu Ala Ser Pro Thr Lys
50 55 60

Thr Ile Lys Asn Met Leu Thr Val Pro Ser Ser Pro Leu Ser Pro Ala
65 70 75 80

- 24 -

Thr Gly Gly Ser Val Lys Ile Val Gln Met Thr Pro Val Thr Ser Ala
85 90 95

Met Thr Thr Ala Lys Trp Leu Arg Glu Val Ile Ser Ser Leu Pro Asp
100 105 110

Lys Pro Ser Ser Lys Leu Gln Gln Phe Leu Ser Ser Cys Asp Arg Asp
115 120 125

Leu Thr Asn Ala Val Thr Glu Arg Val Ser Ile Val Leu Glu Ala Ile
130 135 140

Phe Pro Thr Lys Ser Ser Ala Asn Arg Gly Val Ser Leu Gly Leu Asn
145 150 155 160

Cys Ala Asn Ala Phe Asp Ile Pro Trp Ala Glu Ala Arg Lys Val Glu
165 170 175

Ala Ser Lys Leu Tyr Tyr Arg Val Leu Glu Ala Ile Cys Arg Ala Glu
180 185 190

Leu Gln Asn Ser Asn Val Asn Asn Leu Thr Pro Leu Leu Ser Asn Glu
195 200 205

Arg Phe His Arg Cys Leu Ile Ala Cys Ser Ala Asp Leu Val Leu Ala
210 215 220

Thr His Lys Thr Val Ile Met Met Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Thr
225 230 235 240

Gly Leu Thr Ala Phe Asp Leu Ser Lys Ile Ile Glu Asn Phe Val Arg
245 250 255

His Glu Glu Thr Leu Pro Arg Glu Leu Lys Arg His Leu Asn Ser Leu
260 265 270

- 25 -

Glu Glu Gln Leu Leu Glu Ser Met Ala Trp Glu Lys Gly Ser Ser Leu

275 280 285

Tyr Asn Ser Leu Ile Val Ala Arg Pro Ser Val Ala Ser Glu Ile Asn

290 295 300

Arg Leu Gly Leu Leu Ala Glu Pro Met Pro Ser Leu Asp Asp Leu Val

305 310 315 320

Ser Arg Gln Asn Val Arg Ile Glu Gly Leu Pro Ala Thr Pro Ser Lys

325 330 335

Lys Arg Ala Ala Gly Pro Asp Asp Asn Ala Asp Pro Arg Ser Pro Lys

340 345 350

Arg Ser Cys Asn Glu Ser Arg Asn Thr Val Val Glu Arg Asn Leu Gln

355 360 365

Thr Pro Pro Pro Lys Gln Ser His Met Val Ser Thr Ser Leu Lys Ala

370 375 380

Lys Cys His Pro Leu Gln Ser Thr Phe Ala Ser Pro Thr Val Cys Asn

385 390 395 400

Pro Val Gly Gly Asn Glu Lys Cys Ala Asp Val Thr Ile His Ile Phe

405 410 415

Phe Ser Lys Ile Leu Lys Leu Ala Ala Ile Arg Ile Arg Asn Leu Cys

420 425 430

Glu Arg Val Gln Cys Val Glu Gln Thr Glu Arg Val Tyr Asn Val Phe

435 440 445

Lys Gln Ile Leu Glu Gln Gln Thr Thr Leu Phe Phe Asn Arg His Ile

450 455 460

PCT / E S 95 / 00130

- 26 -

Asp Gln Leu Ile Leu Cys Cys Leu Tyr Gly Val Ala Lys Val Cys Gln
465 470 475 480

Leu Glu Leu Thr Phe Arg Glu Ile Leu Asn Asn Tyr Lys Arg Glu Ala
485 490 495

Gln Cys Lys Pro Glu Val Phe Ser Ser Ile Tyr Ile Gly Ser Thr Asn
500 505 510

Arg Asn Gly Val Leu Val Ser Arg His Val Gly Ile Ile Thr Phe Tyr
515 520 525

Asn Glu Val Phe Val Pro Ala Ala Lys Pro Phe Leu Val Ser Leu Ile
530 535 540

Ser Ser Gly Thr His Pro Glu Asp Lys Lys Asn Ala Ser Gly Gln Ile
545 550 555 560

Pro Gly Ser Pro Lys Pro Ser Pro Phe Pro Asn Leu Pro Asp Met Ser
565 570 575

Pro Lys Lys Val Ser Ala Ser His Asn Val Tyr Val Ser Pro Leu Arg
580 585 590

Gln Thr Lys Leu Asp Leu Leu Ser Pro Ser Ser Arg Ser Phe Tyr
595 600 605

Ala Cys Ile Gly Glu Gly Thr His Ala Tyr Gln Ser Pro Ser Lys Asp
610 615 620

Leu Ala Ala Ile Asn Ser Arg Leu Asn Tyr Asn Gly Arg Lys Val Asn
625 630 635 640

Ser Arg Leu Asn Phe Asp Met Val Ser Asp Ser Val Val Ala Gly Ser
645 650 655

POT / E S 96 / 8 0 1 3 0

- 27 -

Leu Gly Gln Ile Asn Gly Gly Ser Thr Ser Asp Pro Ala Ala Ala Phe

660

665

670

Ser Pro Leu Ser Lys Lys Arg Glu Thr Asp Thr

675

680

0

- 27a -

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

5

El micro-organismo a que se hace referencia en la página 7 de la descripción ha sido depositado en la institución siguiente:

10

COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
46100 BURJASOT (Valencia)

15

España

Identificación del depósito: PBS.Rb1

Fecha de depósito: 12 Junio 1996

20

No. de orden: 4699

Estas indicaciones aparecen reflejadas en el formulario PCE/RO/134 adjunto al petitorio.

25

REIVINDICACIONES

1. Uso de una proteína de retinoblastoma (Rb) para el control del crecimiento de células vegetales y/o virus vegetales.
5
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el virus requiere la integridad de un motivo de aminoácidos LXCXE en una de sus proteínas para la reproducción normal.
10
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el virus es un Geminivirus.
- 15 4. Un procedimiento para controlar el crecimiento de una célula vegetal o de un virus vegetal dentro de esa célula, que comprende el aumento o disminución del nivel y/o actividad de una proteína de retinoblastoma en esa célula vegetal.
20
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el nivel de proteína se aumenta por aplicación directa.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el nivel de proteína se aumenta mediante la introducción de ADN o ARN que codifica para su expresión, en la célula vegetal que se desea tratar.
30
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, 5 ó 6, en el que la proteína se sobre-expresa.
- 35 8. Un procedimiento para controlar el crecimiento de una célula vegetal o de un virus vegetal, que comprende expresar una proteína Rb o un fragmento peptídico de la

misma que interacciona con el motivo LXCXE del virus, pero no afecta al funcionamiento normal de la célula, de forma que se inhibe el crecimiento vegetal o el crecimiento viral normal.

5

9. Ácido nucleico recombinante que codifica para la expresión de una proteína Rb que tiene una o varias características de la proteína Rb vegetal no compartidas por la proteína Rb animal.

10

10. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque comprende una o varias regiones características que difieren del ácido nucleico de la proteína Rb animal conocido.

15

11. Ácido nucleico recombinante en forma de ADN o ARNc que codifica para una proteína Rb vegetal que tiene subdominios de bolsillo A y B que tienen una secuencia con una homología del 30% al 75% con la proteína Rb humana.

20

12. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene una secuencia con una homología del 30% al 75% con la proteína de retinoblastoma Rb p130.

25

13. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, caracterizado porque tiene una homología del 50% al 64% con la proteína de retinoblastoma Rb animal o p130.

30

14. Ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que codifica para el aminoácido C706 de la Rb humana.

35

15. Ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en la que la secuencia

- 30 -

espaciadora entre los bolsillos A y B no se conserva con respecto a proteínas animales.

16. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la secuencia espaciadora tiene una homología menor del 50% con respecto a la misma región encontrada en proteínas de retinoblastoma animal.

17. Ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 que tiene una homología del 80% o mayor con el de la SEC NO 2.

18. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la homología es del 90% o mayor.

19. ADN recombinante que comprende una secuencia que corresponde a la SEC ID No 1, bases 31 a 2079.

20. ADN recombinante que comprende una secuencia que corresponde a la SEC ID No 1 o que corresponde a ARN que codifica para el clon de ADNc de maíz que codifica ZmRb1 de SEC ID No 2.

21. Proteína codificada por el ADN o el ARN recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20 o nuevas proteínas derivadas de dicho ADN o ARN, y proteína derivada de ADN o ARN que se produce de forma natural alterado por medios mutagénicos.

22. Proteína de acuerdo con la reivindicación 21, en la que el medio mutagénico comprende mutagénesis usando cebadores de PCR mutagénicos.

23. ADN o ARN antisentido de un gen que codifica una proteína retinoblastoma de planta, un gen que posee la

secuencia de ácido nucleico como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 20.

24. Vectores, células, plantas o animales que comprenden 5 el ADN o el ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21.

25. Un método de controlar el crecimiento y/o la 10 proliferación de una célula vegetal o de un virus de plantas que comprende la disminución de los niveles de proteína retinoblastoma de plantas en la célula por incorporación a la célula de ADN o ARN antisentido a la proteína retinoblastoma.

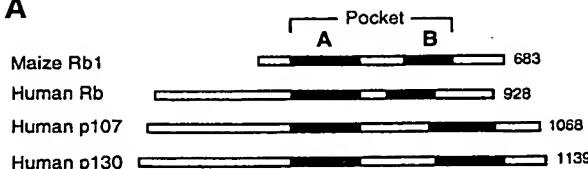
15 26. ADNc que codifica una proteína como se reivindica en la reivindicación 21.

27. Un ácido nucleico que codifica una proteína en la 20 que uno o más de estos sitios están alterados o deleticados, haciendo a la proteína más resistente a la fosforilación y así, a su funcionalidad, por ejemplo, unión a E2F o similares.

28. Una proteína codificada por el ácido nucleico que se 25 describe en la reivindicación 27.

RESUMEN

La presente invención se basa en el aislamiento y caracterización de una secuencia de ADN de células de plantas que codifica una proteína retinoblastoma. Dicho hallazgo está basado en las propiedades estructurales y funcionales de la proteína retinoblastoma de plantas como posible regulador del ciclo celular, del crecimiento celular y de la diferenciación celular en plantas. Por todo ello, se reivindican, entre otros aspectos, la utilización de la proteína retinoblastoma o de la secuencia de ADN que la codifica en el control del crecimiento de células vegetales, plantas y/o virus vegetales, así como la utilización de vectores, células, plantas o animales o células animales modificados a través de la manipulación de la ruta de control basada en la proteína retinoblastoma de plantas.

A**B****Pocket A**

Maize Rb1	89	TPVISAMITPA KWMREVITSSL HDKEPSSKIDQQ FLSSCQDILT NAVITERVSIV LEAIFPTKSS ANRGVSLGLN CANAFDIPWA EARKVEASKL	180
Xenopus Rb	348	TPVIGAMMTV QOQMVTILESA NDKPPDIDQS VFSNCITVNPK TKIITDRIEHF GHVF.....K EKFASSVQG. .ACAELI..G YQRYKLGVCL	427
Chicken Rb	362	TPVIAAMMTI QOQMVTILESA IDKPSDIDIA YFNNCTVNPE DSILKRVVECL GHIF.....K KKFAEAVGQ. .GCAEIL..G SQRVQLGVRL	441
Mouse Rb	367	TPVITVMMTI QOQMVTILESA SDQPSENDIS YFNNCTVNPK ENILKRVVKDV GHIF.....K EKFANAVGQ. .GCVDI..G VQRYKLGVRL	446
Human Rb	373	TPVITVMMTI QOQMVTILESA SDQPSENDIS YFNNCTVNPK ESILKRVVKDI GYIF.....K EKFAKAVGQ. .GCVBI..G SQRYKLGVRL	452
Human p107	385	TPVISATQSV SPSISIVGQ KNPAPSQDILN IFPESCVRNVPV ENIMKILKGI GETF.....C QHYTOSTDDEO PGSHJDF..A VNRLKLAEL	467
Human p130	417	TPVISATQSV SPSISIVGQ KNPAPSQDILN ILRTGSRDPT QALANILKEM FEIY.....S QHF.QPDEDF SNCAKEI..A SKHFRFAEML	498
	180	YYRVVLEAICR AELQNSNVN IATFLLSNERF HRCCLIACSAF IIVLATHK.....TV IMMPFAVLES TGFITAPDLSK TIEFVFRHBE	259
	428	YYRVVMEAILK TCEERLVSFH FSKILLLNDIF HICLLACAVME VVVASYARNA SQAY.CSSGT NLSFEWILRA FELKAFDFYK VIECFIRKABP	516
	442	YYRVVMEASMLK SSEEERLVSFH FSKILLLNDIF HTSLLACALE IIVMATTYGRTA SQSDGTSAAET DLSPEWILNV LNLKAFDFYK VIESFIRKVEP	531
	447	YYRVVMEASMLK SSEEERLVSFH FSKILLLNDIF HMSLLACALE VVMAATTYRSRT LQHLD..SGT DLSPEWILNV LNLKAFDFYK VIESFIRKVEA	534
	453	YYRVVMEASMLK SSEEERLVSFH FSKILLLNDIF HMSLLACALE VVMAATTYRSRT SQNLD..SGT DLSPEWILNV LNLKAFDFYK VIESFIRKVEG	540
	468	YYKLVLETIVMV QETTRRLHGMD MSVLLLEQDIF FRSLLMACCLE IIVLFANSSPR ..TPEWIIKEV LNLOPFFYFK VIEBVIRSEE	545
	499	YYRVVLESVIE QEQKRLGMDM ILSCLLEQDAF HRSLLACCLE VVTFSYKPPG ..NPFITFEI FDVPLYHFK VIEVFRABD	576
	260	TLPEELKRRH NSLSEEQTLIES MAWEKGSSILM 289	
	517	SLTSNMIRYD ERCEHQRIMEC LAWSQSDSPF 546	
	532	SLSTRDMIRKH ERCEHHRIMES LAWQSDSPF 561	
	535	NLTREMIKHH ERCEHHRIMES LAWLSDSPF 564	
	541	NLTREMIKHH ERCEHHRIMES LAWLSDSPF 570	
	546	GLSRDMDVKHH NSLSEEQTLIES LAWSHSDALW 575	
	577	GLCREVVKHH NQIBEQTLIH LAWKPESPFW 606	

Pocket B

Maize Rb1	405	NEKCADVTTIH IIFRSKILKLA AITIRNLICER VQG..VEQTE RYVYINVFKQIL ECOTTEFFNR HIDOLLILCCL YGVAVVCQLE LTIREILNNY	492	
Xenopus Rb	614	QKQSTSLSS.. LFYKKVYLLA YKRLQSSLCS LLDSDHPELEQ VITWLLQHIL QQEYELMRDR HLDQIMMCMS YGICKAKNID LRKETIVTAY	701	
Chicken Rb	630	QKPKSTSLSS LFYKKVYFLA YLRLHHTLFFR LLSEHDPDLEP LIWTLFQHIL QNESELMRDR HLDQIMMCMS YGICKVKNID LRKETIVTAY	719	
Mouse Rb	632	QKPLKSTSLA LFYKKVYFLA YLRLHHTLCAR LLSDHPELEH IIWTLFQHIL QNEYELMRDR HLDQIMMCMS YGICKVKNID LRKETIVTAY	721	
Human Rb	639	QKPLKSTSLS LFYKKVYFLA YLRLHHTLCAR LLSEHPELEH IIWTLFQHIL QNEYELMRDR HLDQIMMCMS YGICKVKNID LRKETIVTAY	728	
Human p107	780	NRPKRTGSLA LFYKKVYFLA SVRLRDLCLK LDVSN.ELRK KIWTICFEFTL VHCPCDLMRDR HLDOLLILCAF YIMAVVTKEE RTDQEIMKSV	868	
Human p130	828	NRPKRTSSLI LFYKKVYFLA AVRLRDECALK IISD.ELRK KIWTICFEFTL IQCPEDMMDR HLDOLLIMCAI YVMAVVTKEE KSDONLIMRCY	916	
	493	RREAQCKPEV FSSITM.....	..GSTNRNG VLVSRRHVGII	525
	702	KGLLTNTNQET FKRVLILR.....	..DQHQDSDII	726
	720	KELPNTNQET FKRVLILR.....	..EQYQDSDII	744
	722	KDLPHAAQET FKRVLILR.....	..EEFDSDII	746
	729	KDLPHAAQET FKRVLILK.....	..EEYDSDII	753
	869	RNQPOQANSHV YRSVILK.....SIP REVVAYNKNI NDDFEMID.....	..CDLED ATKTPDCSSG PVKEERSDII	931
	917	RTQPQARSQV YRSVILKGR KRRNSGSSDS RSHQNSPTEL NKDRTSRDSS PVMRSSSTLP VPQPSSAPPT PTRLTGANS MEEEERGDLI	1006	
	1007	CFYNNIYIKQ IKTFA 1002		

2/2

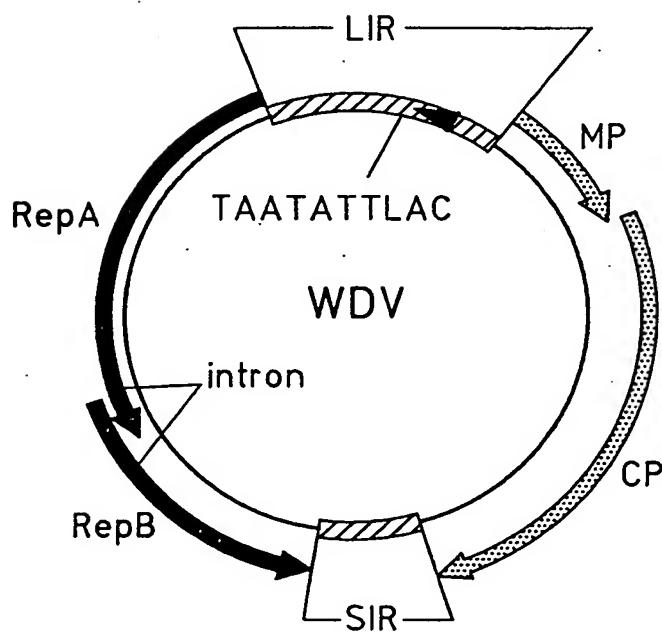
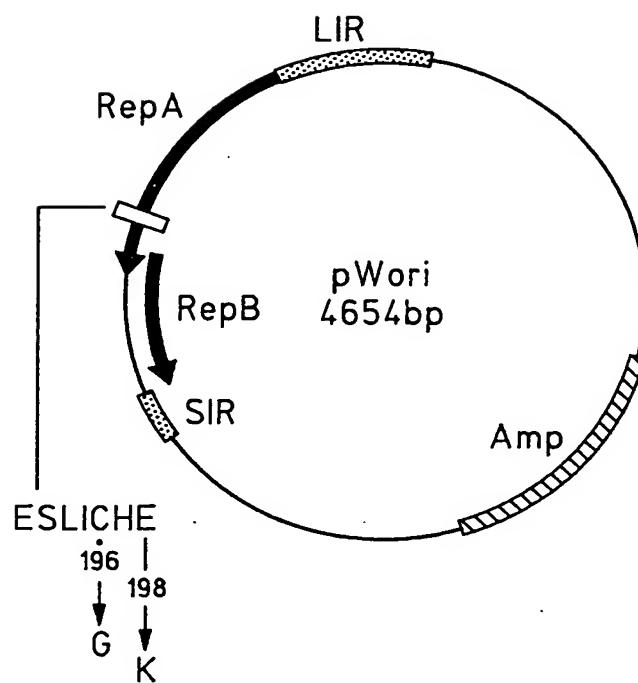


Fig. 2

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>7</u> , línea <u>32 y siguientes</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO <u>pBS.Rb1</u> Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito <u>COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)</u>	
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias Biológicas 46100 BURJASOT (Valencia) ESPAÑA	
Fecha de depósito <u>12 JUNIO 1996</u>	nº de orden <u>4699</u>
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario) Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")	

Reservado a la oficina receptora

 Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado



Reservado a la Oficina internacional

 Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:

Funcionario autorizado